线粒体核糖体蛋白 MRPS28 参与碳离子辐照诱导 A549 细胞凋亡研究

黄国敏 [1,2,3,4,5]，张金花 [1,2,3,4,5]，窦志慧 [1,2,3,4,5]，包兴婷 [1,2,3,4,5]，
柳佳娣 [1,2,3,4,5]，徐度玲 [1,2,3,4,5]，李鸿岩 [1,2,3,4,5,*]，张红 [1,2,3,4,5,*]

[1](中国科学院现代物理研究所医学物理研究室，兰州，730000)

[2](中国科学院重离子辐照生物学与医学重点实验室，兰州，730000)

[3](重离子辐照医学应用基础研究重点实验室，兰州，730000)

[4](中国科学院大学核科学与技术学院，北京，101408)

[5](先进能源科学与技术广东实验室，惠州，516029)

通讯作者：张红，*E-mail: zhangh@impcas.ac.cn；李鸿岩，E-mail: lihy@impcas.ac.cn

摘要：

目的：探究线粒体核糖体蛋白 MRPS28 影响碳离子辐照诱导 A549 细胞凋亡的机制。

方法：采用 siRNA 敲低 MRPS28 并构建稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞系；碳离子束和 X 射线辐照细胞；CCK-8 实验检测细胞增殖率；克隆存活实验检测细胞存活率；流式细胞仪检测细胞凋亡、活性氧、线粒体膜电位；qRT-PCR 实验检测相关基因；Western Blot 实验检测凋亡相关蛋白。

结果：非小细胞肺癌 A549 细胞暴露于碳离子辐照后细胞中 MRPS28 表达量下降；相对于对照组，MRPS28 敲低能够降低 A549 细胞的增殖及克隆存活率，同时增加细胞中 ROS 含量，降低线粒体膜电位，并通过 p53 介导的线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡；敲低 MRPS28 并联合碳离子辐照显著降低了 A549 细胞增殖和存活率，促进辐照后的细胞凋亡。

局限：MRPS28 低表达增加 A549 细胞的碳离子辐照敏感性，但具体机制还有待研究。

结论：初步证明 MRPS28 低表达参与碳离子辐照诱导的 A549 细胞凋亡，并增强 A549 细胞对碳离子束的辐射敏感性。

关键词：碳离子辐照；A549 细胞；线粒体核糖体蛋白；凋亡；p53

中图分类号：Q691 **文献标志码：**A

本文系国家重点研发计划（2018YFE0205100）；国家自然科学基金（11875061，12005042）；中央政府引导地方科技发展资金（甘肃省）（GSCK2021-51-11）；甘肃省自然科学基金（20JR5RA550）；广东省自然科学基金项目（2021A151010027）的研究成果之一。

作者简介：黄国敏（1995-），女，重庆奉节人，博士研究生；从事生物物理学研究；E-mail: huangguomin@impcas.ac.cn;

Mitochondrial ribosomal protein MRPS28 participates in apoptosis of A549 cells induced by carbon ion irradiation

Guomin Huang [1, 2, 3, 4, 5,] Jinhua Zhang [1, 2, 3, 4, 5,] Zhihui Dou [1, 2, 3, 4, 5,]
Xingting Bao [1, 2, 3, 4, 5,] Jiadi Liu [1, 2, 3, 4,] Duling Xu [1, 2, 3, 4,] Hongyan Li [1, 2, 3, 4, 5,*]
and Hong Zhang [1, 2, 3, 4, 5, *]

[1](Department of Medical Physics, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, 730000, China)

[2](Key Laboratory of Heavy Ion Irradiation Biology and Medicine of Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, 730000, China)

[3](Key Laboratory of Basic Research on Heavy Ion Irradiation Application in Medicine, Lanzhou, 730000, China)

[4](College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

[5](Advanced Energy Science and Technology Guangdong Laboratory, Huizhou, 516029, China)

Abstract:

Purpose: To investigate the mechanism by which mitochondrial ribosomal protein MRPS28 affects carbon ion irradiation-induced apoptosis in A549 cells.

Methods: siRNA was used to knock down MRPS28 and establish a stable MRPS28-knockdown A549 cell line; Cells were irradiated with carbon ion and X-ray; CCK-8 assay was performed to assess cell proliferation; Clonogenic survival assay measured cell survival rate; Flow cytometry detected apoptosis, reactive oxygen species (ROS), and mitochondrial membrane potential; qRT-PCR examined relevant genes; Western Blot analyzed apoptosis-related proteins.

Results: Exposure of non-small cell lung cancer A549 cells to carbon ion irradiation led to decreased MRPS28 expression; Compared to the control group, MRPS28 knockdown reduced A549 cell proliferation and clonogenic survival, increased ROS levels, decreased mitochondrial membrane potential, and induced apoptosis through the p53-mediated mitochondrial apoptotic pathway; MRPS28 knockdown combined with carbon

ion irradiation significantly reduced A549 cell proliferation and survival, promoting apoptosis after irradiation.

Limitation: MRPS28 down-regulation increased the sensitivity of A549 cells to carbon ion irradiation, but the specific mechanism requires further investigation.

Conclusion: This study preliminarily demonstrates that MRPS28 down-regulation is involved in carbon ion irradiation-induced apoptosis in A549 cells and enhances A549 cell sensitivity to carbon ion.

Key words: Carbon ion irradiation; A549 cells; Mitochondrial ribosomal protein; Apoptosis;p53

1 引言

重离子因为其质量大，穿透物体时散射角度小，高线性能量传递等特性，在精准定位肿瘤的情况下，可以实现更为精准的放疗——未到达肿瘤部位时对正常机体损伤小，到达肿瘤部位时集中高放能，穿透肿瘤后能量迅速衰减 [1]。在中国近 50 年因癌症死亡的患者中，肺癌患者的死亡率最高且死亡率增长最快 [2]。放疗是治疗肺癌的重要手段之一，约 60%-70%的肺癌患者在治疗过程中需要使用放疗，如早期、中期的根治性放疗及晚期的姑息性放疗。虽然放射治疗肺癌的技术相对成熟，但是重离子辐照作为一种特殊的放疗方式，其治疗机制并没有明确的范式，有大量研究者们在探索重离子治疗癌症的机理 [3, 4]。

线粒体核糖体存在于线粒体中，其结构与细胞质核糖体类似，具有大、小两种亚基。线粒体核糖体上共有 89 种线粒体核糖体蛋白(Mitochondrial ribosomal proteins， MRPs)，MRPs 在细胞凋亡中发挥作用，目前已鉴定出三种与细胞凋亡相关的 MRPs，分别是 MRPS29、MRPL41 和 MRPS30。MRPS29 参与细胞凋亡过程中线粒体网络动态的改变，高表达 MRPS29 可促进细胞凋亡 [5]。MRPL41 具有较多扩展构象，与 16S rRNA 和周围的 MRPs 相互作用，其中包括另一种促凋亡蛋白 MRPS30 [6]。研究发现 MRPL41 过表达增强了 p53 的稳定性，并使其易位到线粒体，从而促进 p53 介导的细胞凋亡过程 [7]。同时 MRPs 还可以作为肿瘤发生发展的标志物 [8]，根据 GEPIA 数据库（http://gepia.cancer-pku.cn）查询结果，多种 MRPs 在不同肿瘤组织中异常表达，如 MRPS28、MRPL20、MRPS16 等在肺癌中高表达，并且 MRPs 高表达伴随着更差的预后性。MRPS28 是属于线粒体核糖体小亚基上的一种蛋白质。MRPS28 异常表达影响线粒体翻译过程 [9]，也有研究表明 MRPS28 在线粒体代谢中起重要作用 [10]，而 MRPS28 在细胞凋亡及放射治疗敏感性中的作用目前还没有研究。

本研究发现 A549 细胞暴露于碳离子辐照后细胞中 MRPS28 的表达量降低，细胞凋亡率增加，通过设计 siRNA 和构建稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞系两种方法敲低细胞中 MRPS28，证明了 MRPS28 低表达参与碳离子辐照诱导 A549 细胞凋亡的过程，对探索碳离子放射治疗肺癌的机制研究有积极作用。期望可以为未来推进非小细胞肺癌的重离子放射治疗提供理论帮助。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

人非小细胞肺癌 A549 细胞购买于上海复祥生物科技有限公司，用含 10%胎牛血清（FBS；Cellmax，中国上海）的 DMEM 培养基置于 37° C，5% CO_2 的环境中培养。实验所用的细胞均为对数期生长的细胞。

2.2 碳离子辐照

碳离子由中国科学院近代物理所重离子束研究装置 HIRFL（Heavy Ion Research Facility in Lanzhou）和兰州重离子医院的医用重离子加速器装置提供。HIRFL 装置终端能量为 80 Mev/u，LET 为 50 keV/μm；兰州重离子医院的加速器装置能量为 100 Mev/u，LET 为 50 keV/μm。

2.3 TMT 定量蛋白质组学分析

4 Gy 碳离子辐照 A549 细胞后 48 h，提取细胞中蛋白用液氮冻干研磨成粉末，BCA 法对蛋白进行定量。每个样品取适量蛋白用 FASP (Filter aided proteome preparation)方法进行胰蛋白酶酶解，再使用 C18 柱对酶解肽段脱盐。肽段冻

干后加入 40 μL Dissolution buffer 复溶，肽段定量（OD280）。质谱数据用 Mascot2.2 和 Proteome Discoverer1.4 软件查库鉴定及定量分析。

2.4 MRPS28 特异性 siRNA 瞬时转染 A549 细胞

设计 siRNA 片段，见表 1：

表 1　siRNA 序列

基因名称	名称简写	序列（5'-3'）
MRPS28-Homo-58	si-58	正义链：CUGCGAGUGUUUCUCUUCUTT
		反义链：AGAAGAGAAACACUCGCAGTT
MRPS28-Homo-122	si-122	正义链：GUAGUUCCAAUGCCAAGGATT
		反义链：UCCUUGGCAUUGGAACUACTT
MRPS28-Homo-314	si-314	正义链：GACGGAUCUUUCAUAUUGUTT
		反义链：ACAAUAUGAAAGAUCCGUCTT

采用阳离子脂质体试剂转染法下调 A549 细胞中 MRPS28 基因表达。细胞以 1.5×10^5/孔接种于 φ35 培养皿中，用 opti-mem 无血清培养基稀释的吉玛基因转染试剂和 siRNA 进行转染，转染 8 h 后更换为正常培养基，继续培养 24、48、72 h 后提取细胞中 RNA，继续培养 48 h 后提取细胞中蛋白质。

2.5 CRISPR/Cas9 构建稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞系

第一步，A549 细胞接种于 6 孔板中，当细胞汇合度 70%-80%，稀释病毒原液为 1×10^8 TU/mL。病毒原液采用三质粒的第二代慢病毒包装系统，双 gRNA 表达载体（双 gRNA 序列见表 2）、包装质粒（psPAX2）及包膜质粒（pMD2.G）共转染 293T 细胞。在培养基中加入病毒和 Polybrene（终浓度为 5 μg/mL）。病毒感染 24 h 后更换为普通完全培养基，感染 72 h 后加入杀稻瘟菌素（72-96 h）进行筛选。第二步，将筛选出的细胞接种于 6 孔板中，当细胞汇合度 70%-80%（约 1×10^6 细胞），在培养基中加入病毒（1×10^8 TU/mL）和 Polybrene（终浓度为 5 μg/mL）。病毒原液采用三质粒的第二代慢病毒包装系统，Cas9 载体表达载体、包装质粒（psPAX2）及包膜质粒（pMD2.G）共转染 293T 细胞。病毒感染 24 h 后更换为普通完全培养基，感染 72 h 后加入嘌呤霉素（72-96 h）进行筛选。

表 2　人 MRPS28 基因敲低双 gRNA 载体构建

上游 gRNA 设计		
gRNA 名称	gRNA 序列	PAM 序列
1EX158-1fw	gAGGCGGTTTCGCGAGCGCGT	TGG
1IN30-9fw	gCGGGAATTACGCCAACGACG	CGG
下游 gRNA 设计		
gRNA 名称	gRNA 序列	PAM 序列
2IN1408-1fw	GTTATGTAAACGGCTACTGA	AGG
2IN255-3re	GTGTGGAATGGCTTATTATC	AGG

2.6 qRT-PCR 实验

不同片段 siRNA 转染 A549 细胞 8 h 后换成正常培养基，继续培养 24、48、72 h 后用 TRIzol 试剂提取 A549 细胞中 RNA。使用 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂将 RNA 逆转录为 cDNA，反应条件为：42 ° C，逆转录 30 min，85 ° C 孵育 5 min 灭活逆转录酶。qRT-PCR 使用 TaKaRa TB Green™ Premix Ex Taq™ Ⅱ进行，反应体系为：2 μL cDNA 模板，10 μL SYBR Green，0.8 μL PCR Forward Primer (10 μM)，0.8 μL PCR Reverse Primer (10 μM)，

然后用 ddH_2O 补充至 20 μL。反应条件为：95 ° C 变性 30 s，60 ° C 退火 30 s，72 ° C 延伸 30 s，40 个循环。实验设置五个复孔。

所用引物序列为：

表 2　qPCR 引物列表

基因名称	上游引物（5'-3'）	下游引物（5'-3'）
MRPS28	CTGAGAGTGGATCCGAAAGTGGTA	CTTTGCAGGTCCCATCTGTGTAA
β-actin	TGGCACCCAGCACAATGAA	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

2.7 蛋白免疫印迹实验

采用稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞系，培养 48 h，提取细胞中蛋白。细胞中加入适量的 RIPA（1% PMSF）缓冲液，置于冰上裂解 30 min，4℃，13000 rpm 离心 15 min。用 BCA 蛋白检测试剂盒进行定量。取 25 μg 蛋白在 10% SDS-PAGE 凝胶中分离，恒流(150 mA)转移到 PVDF 膜上，脱脂牛奶(5%)室温封闭 1 h。所用一抗均按 1:1000 稀释，4° C 孵育过夜，漂洗，同源二抗(1:10000 稀释)室温孵育 1 h，充分漂洗后进行显色。

2.8 克隆存活实验

在验证稳定敲低 MRPS28 细胞系中，将各组细胞以 300 个细胞/皿的密度接种于 ф60 培养皿中。培育 14 天后，用 4%多聚甲醛固定细胞团，1%结晶紫染色。在显微镜下对含有 50 及以上细胞数的可见细胞团进行计数。

在敲低 MRPS28 联合辐照的克隆存活实验中，将不同处理组按照不同细胞数接种于 ф60 培养皿中：阴性对照（200）、阴性对照+2 Gy（600）、阴性对照+4 Gy（1500）、敲低组（500）、敲低+2 Gy（1000）、敲低+4 Gy（2000）。培育 16 天后，用 4%多聚甲醛固定细胞团，1%结晶紫染色。在显微镜下对含有 50 及以上细胞数的可见细胞团进行计数。

2.9 流式仪检测细胞凋亡

细胞以 1.5×10^5/孔接种于 ф35 培养皿中，用 opti-mem 无血清培养基稀释的吉玛基因转染试剂和 siRNA 进行转染，转染 8 h 后更换为正常培养基，继续培养 48 h。A549 细胞用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化，800 rpm 离心 4 min，PBS 洗涤 2 次。根据 Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂说明对细胞进行染色。通过流式细胞仪 FlowSight (Amnis，Seattle，WA)检测和分析（IDEAS Application v6.0 软件）细胞凋亡率。

将稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞培养 48 h，收集细胞采用流式仪检测细胞凋亡率，具体操作方法如上。

2.10 流式仪检测活性氧（ROS）

采用凋亡率最高的 si-314 转染 A549 细胞 8 h 后更换为正常培养基，继续培养 48 h 后收集细胞悬浮于 DCFH-DA 溶液（终浓度为 10 μmol/L）中，细胞密度为 $1\text{-}20\times10^5$/mL，混匀后置 37℃环境中孵育 20min。用无血清培养液洗涤细胞 3 次，去除未进入细胞内的 DCFH-DA 后用流式仪检测。

将稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞培养 48 h，收集细胞采用流式仪检测细胞中 ROS 含量，具体操作方法如上。

2.11 流式仪检测线粒体膜电位

利用 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位。采用凋亡率最高的 si-314 转染 A549 细胞 8 h 后更换为正常培养基，继续培养 48 h 后细胞重悬于 0.5 mL 细胞培养基中，加入 0.5 mL JC-1 染色工作液，混匀，置于 37℃环境中孵育 20min。JC-1 染色缓冲液(1 X)洗涤 2 次，加入 200 μL JC-1 染色缓冲液(1 X)重悬，用流式

细胞仪检测分析。

将稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞培养 48 h，收集细胞采用流式仪检测线粒体膜电位，具体操作方法如上。

2.12 数据统计分析

使用 GraphPad Prism 8 统计分析数据的差异性，实验结果以“平均数±误差”表示。其中两组数据之间的比较采用 T tests 检验，多组数据之间的比较采用单因素方差分析。$*p < 0.05$ 的数据被视为有显著性差异。

3 实验结果

3.1 碳离子辐照影响 A549 细胞中 MRPs 表达

蛋白质组学分析结果显示碳离子辐照后 A549 细胞中有 48 种 MRPs 表达量发生变化，其中 14 种表达上调，34 种表达下调（图 1），MRPS28 表达下调。

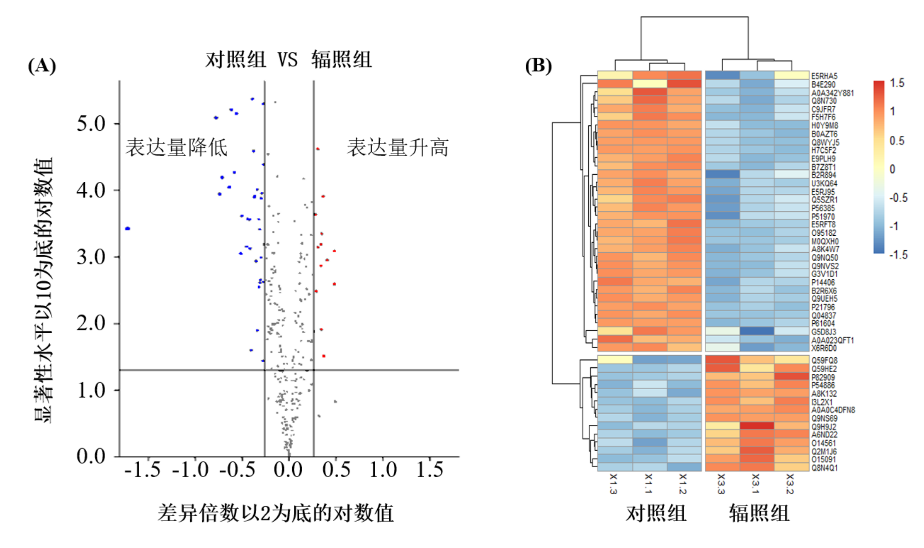


图 1 碳离子辐照对线粒体蛋白表达量的影响

（A）火山图。（B）聚类热图

3.2 MRPS28 低表达抑制 A549 细胞增殖

使用 CCK-8 检测 MRPS28 低表达对 A549 细胞增殖的影响。在不同片段 siRNA 转染 A549 细胞 24、48、72 h 后进行检测，结果如图 2（A）所示，与阴性对照组（空载组）相比，MRPS28 低表达显著抑制了细胞增殖。利用稳定敲低 MRPS28 的细胞系进行试验，阴性对照组和敲低组细胞以相同密度接种于 96 孔板中，分别培养 24、48、72 h 后检测，结果显示稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞增殖速率显著降低（图 2（B））。

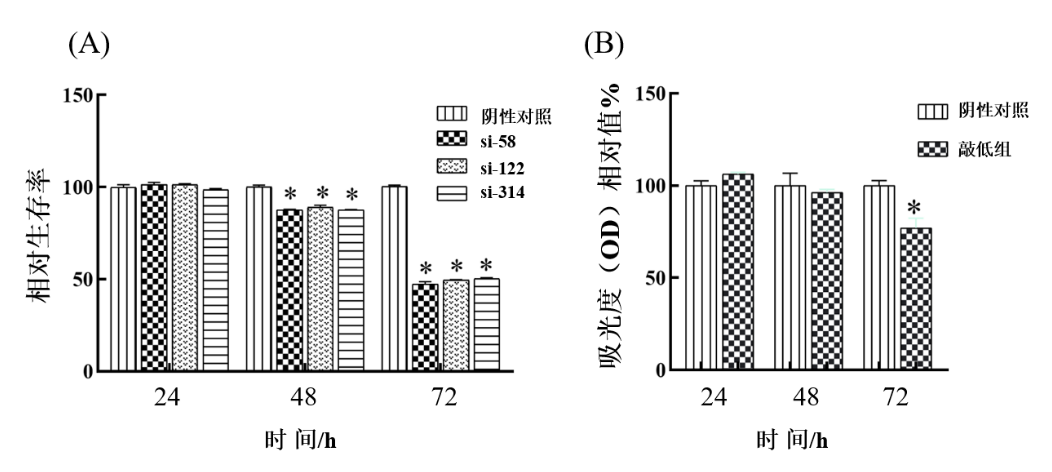


图 2 MRPS28 低表达对 A549 细胞增殖的影响

*p<0.05 对比阴性对照组

3.3 MRPS28 低表达降低 A549 细胞的克隆存活率

为观察 MRPS28 低表达是否对 A549 细胞产生长久的不可逆转的影响，采用稳定敲低细胞株进行克隆存活实验，结果如图 3 所示， MRPS28 低表达显著降低了 A549 细胞的克隆存活率。

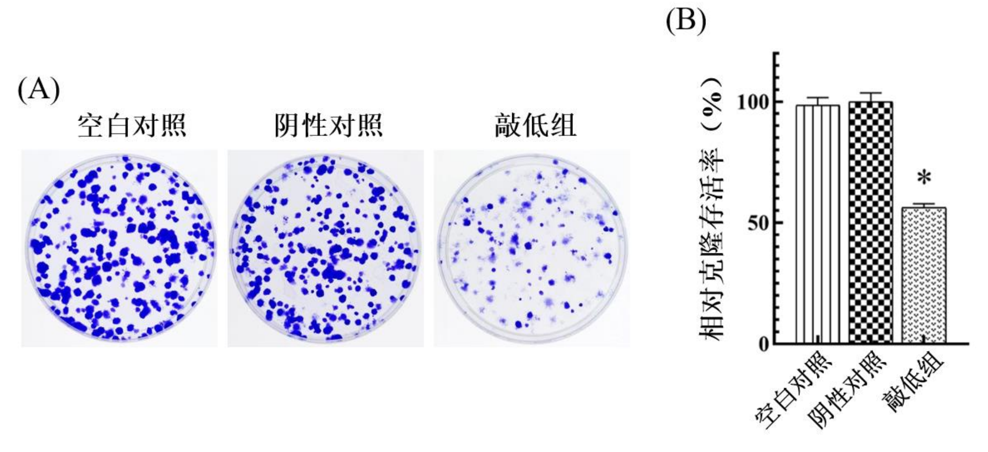


图 3 MRPS28 低表达对 A549 细胞克隆存活的影响

*p<0.05 对比阴性对照组

3.4 MRPS28 低表达降低线粒体膜电位

蛋白质组学分析结果显示，A549 细胞暴露于碳离子辐射后多种线粒体蛋白异常表达，线粒体功能受到损伤。用流式仪检测 MRPS28 低表达对线粒体膜电位的影响发现，稳定敲低 MRPS28 和 si-314 转染 48 h 后的 A549 细胞中线粒体膜电位都有显著降低，JC-1 单体含量显著升高（图 4）。在细胞凋亡过程中线粒体膜电位降低是早期的特征反应之一。

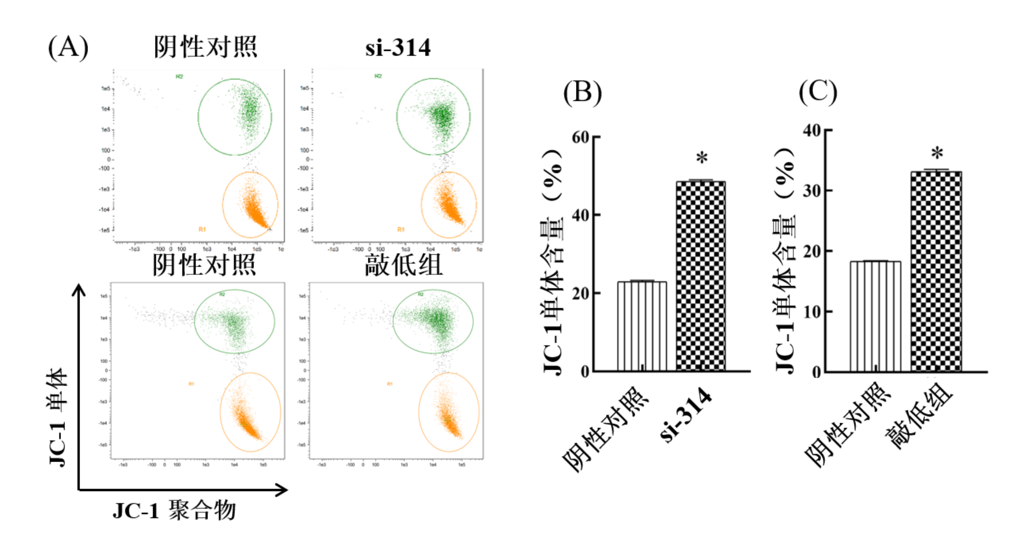


图 4　MRPS28 低表达对线粒体膜电位的影响

（A）流式仪检测 MRPS28 低表达对线粒体膜电位影响的代表图。（B，C）膜电位统计图。*p<0.05 对比阴性对照组

3.5 MRPS28 低表达增加 A549 细胞中 ROS 含量

线粒体是动物细胞中产生 ROS 的主要场所，A549 细胞暴露于碳离子辐射后线粒体膜电位降低，电子传递链异常，可能导致 ROS 含量异常。分别采用稳定敲低 MRPS28 细胞株和 si-314 转染 48 h 的 A549 细胞进行实验，结果如图 5 所示，敲低 MRPS28 后细胞中 ROS 含量显著升高，打破细胞的氧化还原平衡，促使细胞走向凋亡。

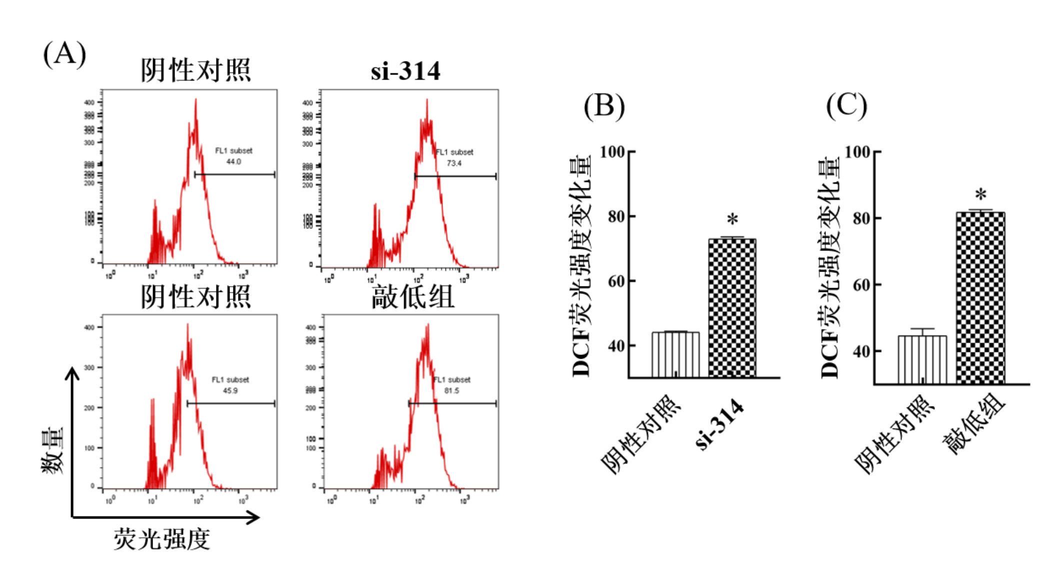


图 5 MRPS28 低表达对细胞中 ROS 含量的影响

（A）流式仪检测 MRPS28 低表达对 A549 细胞中 ROS 含量影响的代表图。（B，C）细胞中 ROS 变化量统计图。*p<0.05 对比阴性对照组

3.6 MRPS28 低表达促进 A549 细胞凋亡

进一步检测 MRPS28 低表达对 A549 细胞凋亡的影响。采用稳定敲低 MRPS28 细胞株和不同片段的 siRNA 转染 48 h 的 A549 细胞进行实验。结果如图 6（A，B）所示，三种不同片段的 siRNA 敲低 MRPS28 都能够促进 A549 细胞凋亡；此外，相比于阴性对照组，稳定敲低 MRPS28 后细胞凋亡率也显著增加（图 6（C，D））。

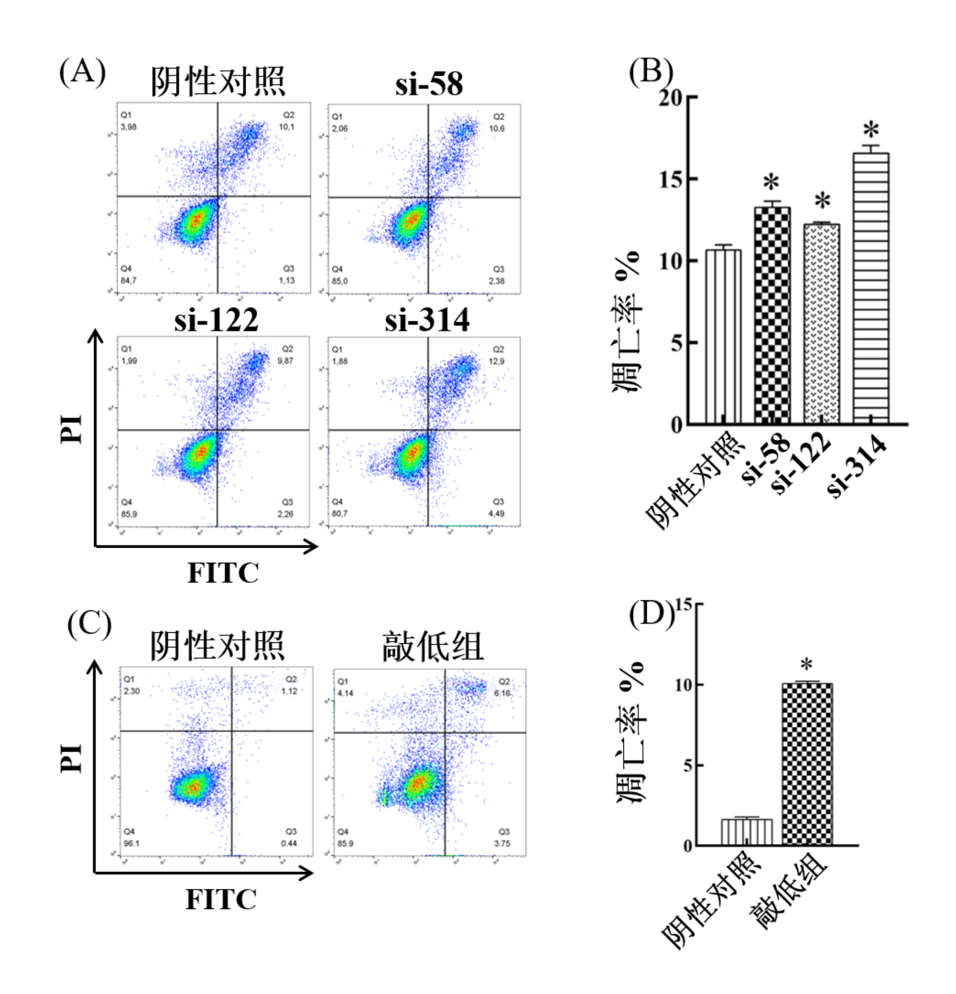


图 6 MRPS28 低表达促进 A549 细胞凋亡

（A，B）siRNA 敲低 MRPS28 对 A549 细胞凋亡的影响。（C，D）稳定敲低 MRPS28 对 A549 细胞凋亡的影响。*p<0.05 对比阴性对照组

3.7 敲低 MRPS28 通过 p53 介导的线粒体途径参与细胞凋亡

利用 SDS-PAGE 电泳检测稳定敲低 MRPS28 的 A549 细胞中线粒体凋亡通路相关蛋白的表达，结果如图 7 所示，MRPS28 低表达后细胞中 p53 蛋白表达量降低，但 p53 N 端 Ser15 位点磷酸化修饰的蛋白表达量升高（图中标注为 P-p53(ser15)），p53 N 端 Ser15 位点磷酸化修饰与细胞凋亡相关 [11];Bax 与 Bcl-2 表达量的比值显著升高，表明线粒体膜通透性增加；将细胞色素 C（图中标注为 Cyto C）释放到细胞质中，启动 Caspase 家族执行凋亡过程，如图 7(B)，Caspase 3 及其剪切体（c-Casp-3）表达量显著增加。表明 MRPS28 低表达通过 p53 介导的线粒体通路诱导细胞凋亡。

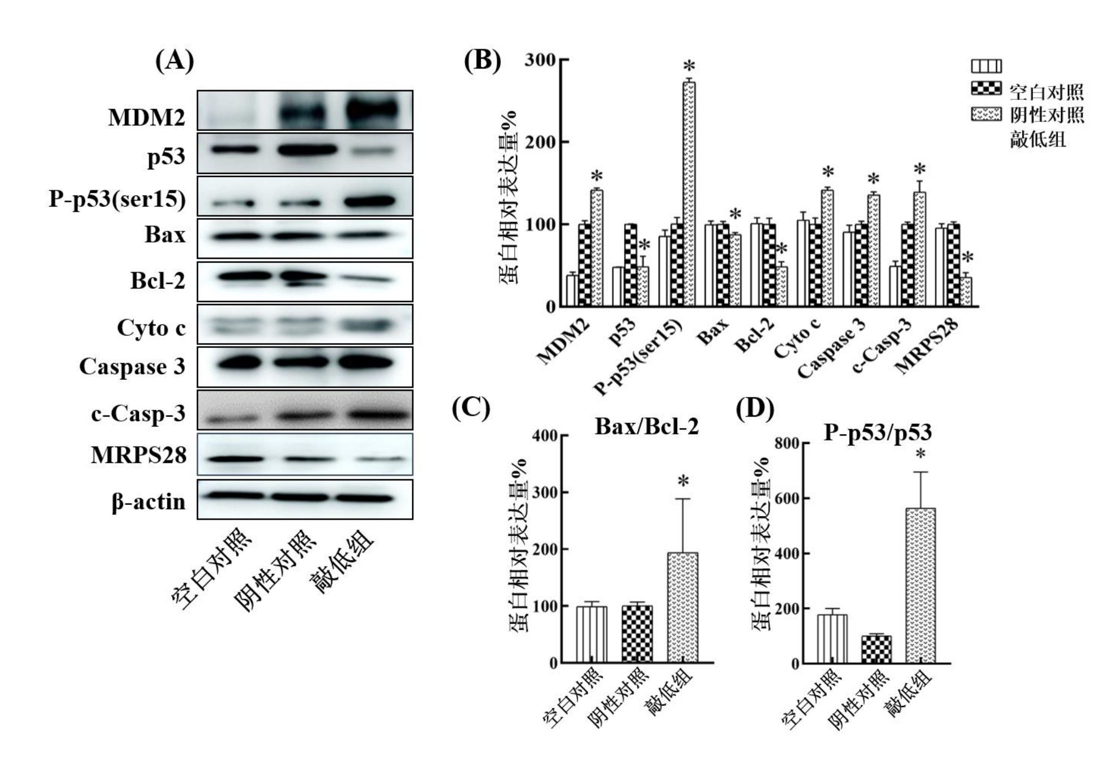


图 7　MRPS28 低表达通过 p53 介导的线粒体凋亡通路参与细胞凋亡

（A）相关蛋白表达量条带。(B-D)相关蛋白表达量统计图。

*p<0.05 对比阴性对照组。(P-p53(ser15)代表 p53 N 端 Ser15 位点磷酸化修饰的蛋白；Cyto C 代表细胞色素 C；c-Casp-3 代表 cleaved Caspase-3）

3.8 敲低 MRPS28 增加 A549 细胞对碳离子的辐照敏感性

将 2、4 Gy 碳离子辐照联合 MRPS28 敲低处理 A549 细胞，分别检测 A549 细胞的增殖、克隆存活和凋亡情况，结果如下所示。

（1） MRPS28 敲低联合碳离子辐照抑制 A549 细胞增殖

各组细胞以 5000 个/孔接种于 96 孔板中，分别培养 24、48、72 h 检测细胞增殖率。相对于单纯的照射组，MRPS28 敲低联合碳离子辐照显著降低了细胞增殖（图 8）和克隆存活率（图 9）。

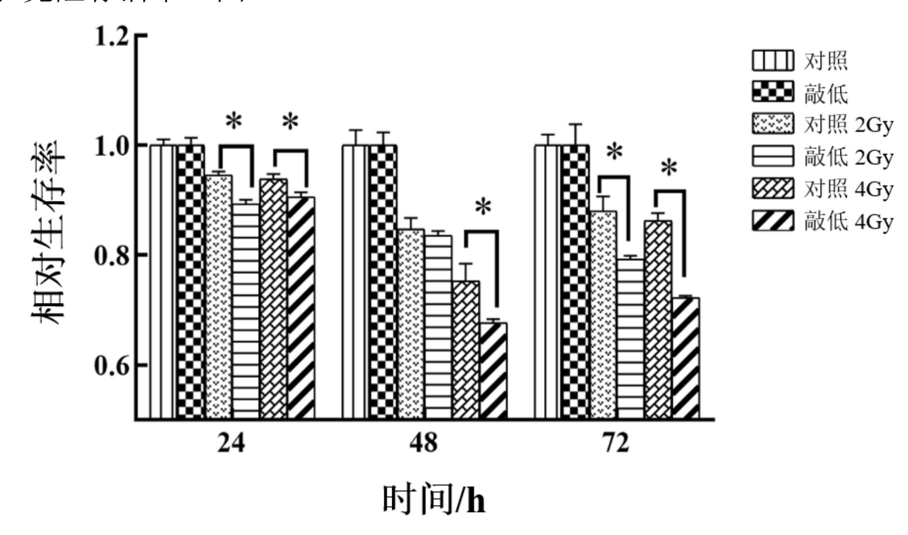


图 8　MRPS28 敲低联合碳离子辐照对 A549 细胞增殖的影响

*p<0.05 对比对照组

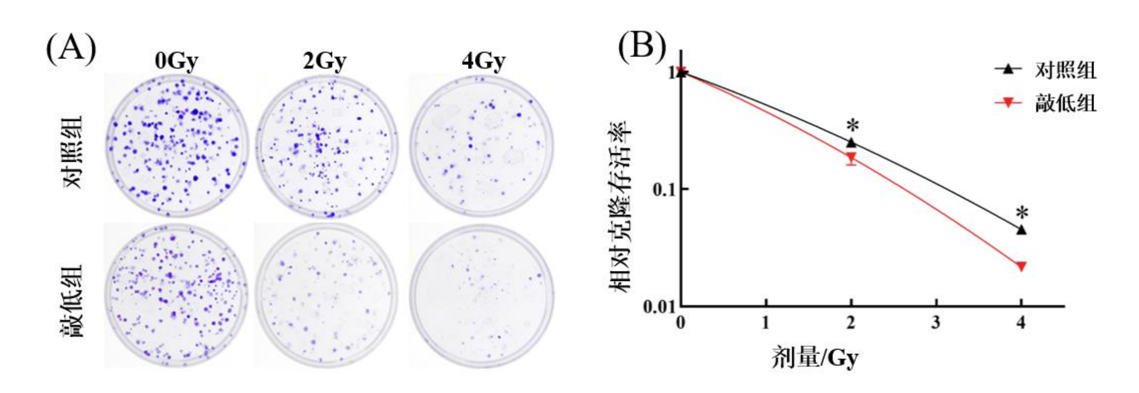


图 9　MRPS28 敲低联合碳离子辐照对 A549 细胞克隆存活的影响

（A）克隆生存实体图。（B）克隆存活率统计图。*p<0.05 对比对照组

（2） MRPS28 敲低联合碳离子辐照增加 A549 细胞凋亡

进一步检测敲低 MRPS28 联合碳离子辐照对 A549 细胞凋亡的影响，结果如图 10 所示。辐照后 48 h，相对于阴性对照组，联合处理组的细胞凋亡率更高，即 MRPS28 敲低后碳离子辐照效果更佳，推测敲低 MRPS28 能够使 A549 细胞对碳离子辐照更加敏感，但具体机制还需要进一步研究。

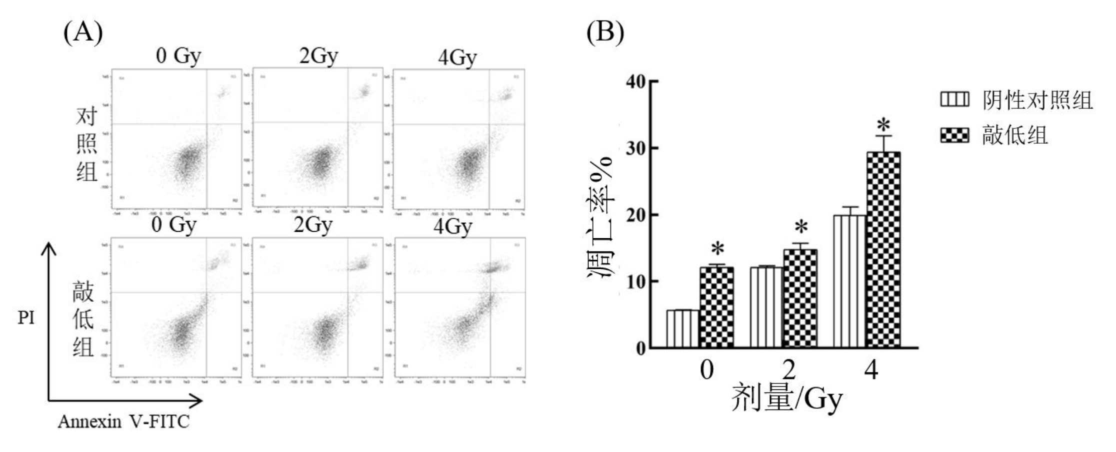


图 10　MRPS28 敲低联合碳离子辐照对 A549 细胞凋亡的影响

（A）流式仪检测 MRPS28 敲低联合碳离子辐照对 A549 细胞凋亡影响的代表图。（B）细胞凋亡统计图。*p<0.05 对比对照组

4　讨论与结论

碳离子辐照对细胞中的 DNA 造成损伤，线粒体是细胞中唯一具有独立 DNA 的细胞器，与细胞核一样是辐照损伤的主要靶点。MRPs 既受到细胞核调控，又受到线粒体调控，所以 MRPs 在 A549 细胞辐照应激反应中起着重要作用。碳离子辐照 A549 细胞后多种 MRPs 表达量下调，主要原因是碳离子辐照损伤了细胞核 DNA，使翻译 MRPs 的基因总量减少。基于碳离子辐照结果，我们采用 siRNA 下调 A549 细胞中 MRPS28 的表达量，发现 MRPS28 低表达抑制细胞增殖，降低细胞克隆存活率;进一步探究 MRPS28 低表达影响细胞生存的原因,实验结果显示 MRPS28 低表达破坏线粒体核糖体翻译功能，直接影响线粒体膜上的电子传递链，导致细胞中 ROS 含量显著升高，线粒体膜电位显著降低，膜通透性增加，释放细胞色素 C，激活凋亡蛋白酶执行细胞凋亡。

MRPs 在肿瘤细胞中高表达，并与较差预后性相关。MRPL15 在卵巢癌中高表

达并与患者预后不良关联，其机制分析表明，MRPL15 在卵巢癌中的高表达可能与其扩增和低甲基化有关，且高表达的 MRPL15 通过细胞周期、DNA 修复和 mTOR 1 等信号通路在卵巢癌中发挥作用 [12]；有研究者发现 MRPS23 过表达可促进肝癌细胞增殖 [13]；与 MRPS23 相似，增加 MRPS18-A 表达量可促进肝癌发生 [14]，且在核糖体蛋白功能探究中发现核糖体蛋白具有除翻译蛋白质以外的作用，它们与细胞增殖、DNA 修复、凋亡、细胞内稳态功能及恶性细胞的转化发展相关 [15]。

MRPS28 低表达后细胞中 ROS 含量增加，线粒体膜电位降低，通过 p53 介导的线粒体凋亡通路参与细胞凋亡。线粒体是产生 ROS 的主要部位，ROS 含量过高能够导致线粒体膜通透性转运孔开放，引起线粒体膜电位降低和细胞色素 C 释放，继而激活一系列 Caspase 酶，执行细胞凋亡过程。在细胞凋亡中，ROS 增加与 Ca^{2+}浓度增加也存在着密切关系，有研究发现在表面活性肽诱导的乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡途径中，ROS 引起内质网和线粒体 Ca^{2+}释放，进而导致线粒体膜通透性转运孔开放和膜电位降低 [16]；线粒体膜通透性转运孔开放和膜电位降低反过来引起细胞质中 Ca^{2+}浓度增加，继而使线粒体中 Ca^{2+}浓度增加，由此形成循环促进线粒体途径的细胞凋亡。ROS 波动还会影响 p53 基因表达，通过诱导 DNA 氧化性损伤等过程促进 p53 活化；p53 通过调控代谢途径或者促氧化和抗氧化基因的表达影响 ROS 水平。p53 在调节细胞凋亡和细胞周期中起着核心作用，对 DNA 损伤、癌基因激活和缺氧等压力产生应激反应，研究者发现其通过多种方式介导线粒体通路凋亡，例如 p53 激活编码凋亡效应因子（PUMA、NOXA、BID、Bax）的基因转录 [17]，并抑制抗凋亡基因（Bcl-2）的转录。MRPS28 低表达后 p53 N 端 Ser15 位点磷酸化修饰的蛋白表达量升高，Bcl-2 表达量显著降低，可能由此激活线粒体凋亡通路。MRPS28 低表达如何影响 p53 表达量的机制还需要进一步研究，有研究报道 MRPS28 等 6 种 MRPs 在 GST 下拉实验中与 p53 相互作用 [18]，但这些相互作用可能是直接作用也可能是间接作用。MRPS28 低表达影响其他多种 MRPs 异常表达，可能通过其他 MRPs 影响 p53，如基于蛋白质相互作用网络分析，发现 MRPS23 和 p53 相互作用 [19]；此前，研究发现 MRPL41 可以触发 p53 定位到线粒体，增强 p53 和 p53 依赖性凋亡的稳定性，但没有观察到 MRPL41 和 p53 之间的直接相互作用 [20]。

在肺癌治疗中约 60%的非小细胞肺癌患者会采用放射疗法，但随着放疗方案的实施，肿瘤细胞本身对电离辐射的耐受性逐渐增加，患者会出现不同程度的辐射抵抗导致放疗效果不佳。影响肺癌放疗的主要因素包括肿瘤细胞乏氧耐受、肿瘤放疗抵抗相关基因的表达及相关抵抗信号通路的激活等 [21]。将碳离子辐照和 MRPS28 敲低联合处理 A549 细胞，发现对比单纯照射组，联合处理组的细胞具有更低的增殖率和克隆存活率，且细胞凋亡率更高，这些实验结果表明 MRPS28 低表达增加了 A549 细胞的碳离子辐照敏感性，但具体机制还有待研究。

参考文献（References）

[1] HU Yiming. Tumor radiophysics[M]. Beijing:Atomic Energy Press,1999:1-36(in Chinese).(胡逸民. 肿瘤放射物理学[M]. 北京：原子能出版社,1999：1-36.)

[2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Chinese medical journal, 2021, 134. 783-791. http://doi.org/10.1097/cm9.0000000000001474

[3] WEI J, SHEN Z, WANG H, et al. European radiology, 2020, 30. 5011-5020. http://doi.org/10.1007/s00330-020-06843-4

[4] ZHOU H, TU C, YANG P, et al. Oncoimmunology, 2022, 11. 2057892. http://doi.org/10.1080/2162402x.2022.2057892

[5] XIAO L, XIAN H, LEE K Y, et al. The Journal of biological chemistry, 2015, 290. 24961-24974. http://doi.org/10.1074/jbc.M115.673343

[6] GREBER B J, BIERI P, LEIBUNDGUT M, et al. Science (New York, N.Y.), 2015, 348. 303-308. http://doi.org/10.1126/science.aaa3872

[7] KIM H J, MAITI P, BARRIENTOS A. Seminars in cancer biology, 2017, 47. 67-81. http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.004

[8] HUANG G, LI H, ZHANG H. Int J Mol Sci, 2020, 21. http://doi.org/10.3390/ijms21228879

[9] PULMAN J, RUZZENENTE B, BIANCHI L, et al. Human molecular genetics, 2019, 28. 1445-1462. http://doi.org/10.1093/hmg/ddy441

[10] JACQUES C, GUILLOTIN D, FONTAINE J F, et al. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2013, 98. E981-989. http://doi.org/10.1210/jc.2012-4006

[11] BELLUSCI G, MATTIELLO L, IANNIZZOTTO V, et al. Cell death & disease, 2019, 10. 726. http://doi.org/10.1038/s41419-019-1961-y

[12] XU H, ZOU R, LI F, et al. Cancer medicine, 2021, 10. 3655-3673. http://doi.org/10.1002/cam4.3907

[13] PU M, WANG J, HUANG Q, et al. Tumour Biol, 2017, 39. 1010428317709127. http://doi.org/10.1177/1010428317709127

[14] ZHOU C, CHEN Z, PENG C, et al. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 2020. http://doi.org/10.1089/cbr.2019.3271

[15] WU J, XIAO Y, SUN J, et al. Journal of hematology & oncology, 2020, 13. 128. http://doi.org/10.1186/s13045-020-00941-y

[16] CHO Y W, KIM E J, NYIRAMANA M M, et al. Cancers (Basel), 2019, 11. http://doi.org/10.3390/cancers11010064

[17] ODA E, OHKI R, MURASAWA H, et al. Science (New York, N.Y.), 2000, 288. 1053-1058. http://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053

[18] REVATHI PARAMASIVAM O, GOPISETTY G, SUBRAMANI J, et al. Journal of biochemistry, 2021, 169. 675-692. http://doi.org/10.1093/jb/mvab004

[19] OVIYA R P, GOPAL G, SHIRLEY S S, et al. Gene, 2021, 790. 145697. http://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145697

[20] YOO Y A, KIM M J, PARK J K, et al. Molecular and cellular biology, 2005, 25. 6603-6616. http://doi.org/10.1128/mcb.25.15.6603-6616.2005

[21] YIN H, WANG X, ZHANG X, et al. Cancer letters, 2020, 494. 121-131. http://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.005

作者贡献声明 ：

黄国敏、李鸿岩、张红：提出研究思路，设计研究方案；

黄国敏、柳佳娣、徐度玲：进行实验；

黄国敏、张金花、窦志慧、包兴婷：采集、清洗和分析数据；

黄国敏、张金花、窦志慧：论文起草；

黄国敏、张红、李鸿岩：论文最终版本修订。